

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-55879

(P2000-55879A)

(43) 公開日 平成12年2月25日 (2000. 2. 25)

(51) Int.Cl.⁷

識別記号

F I

テマコード* (参考)

G 0 1 N 27/447

G 0 1 N 27/26

3 3 1 E

2 G 0 4 3

21/64

21/64

Z

27/26

3 3 1 K

審査請求 未請求 請求項の数 1 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号

特願平10-223991

(22) 出願日

平成10年8月7日 (1998. 8. 7)

(71) 出願人 000001993

株式会社島津製作所

京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地

(72) 発明者 田中 宏

京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地

株式会社島津製作所三条工場内

(74) 代理人 100085464

弁理士 野口 繁雄

Fターム(参考) 2G043 AA01 BA16 CA03 DA02 DA05

DA06 DA09 EA01 EA13 EA19

FA03 GA07 GB01 GB21 GB28

KA09 LA03 MA01 NA01 NA06

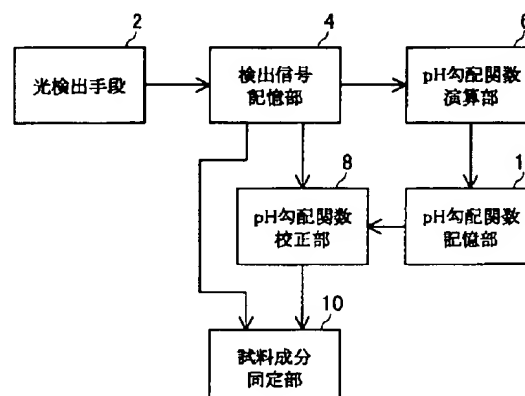
NA16

(54) 【発明の名称】 等電点電気泳動装置

(57) 【要約】

【目的】 試料成分のpHを正確に自動で同定する。

【構成】 複数種類のマーカサンプルを分離し、光検出手段2によりゾーンを移動させずにその分離状態を検出し、検出信号記憶部4に記憶する。pH勾配関数演算部6により各マーカサンプルの検出位置及び等電点に基づいてpH勾配関数 $f(x)$ を算出し、pH勾配関数記憶部12に記憶する。次に、試料とともに複数種類のマーカサンプルを分離し、光検出手段2によりその分離状態を検出し、検出信号記憶部4に記憶する。pH勾配関数校正部8により、第二の分析のデータのマーカサンプルの検出位置及び等電点に基づいて、pH勾配関数記憶部12のpH勾配関数 $f(x)$ を平行移動又は伸縮させてpH勾配関数 $g(x)$ を求める。試料成分同定部10により、pH勾配関数 $g(x)$ と第二の分析のデータから、分離した試料成分のpHを決定する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 透明部材の内部に分離流路が形成された電気泳動部材と、
前記分離流路の両端間に泳動電圧を印加する泳動電源装置と、
前記分離流路の所定の範囲にわたって光を照射する照射手段と、
前記分離流路内で分離された各成分による前記光の吸収又は発光を所定の範囲にわたって検出する光検出手段と、
前記光検出手段の検出信号を前記分離流路の各位置に対応させて記憶する検出信号記憶部と、
複数種類の等電点既知のマーカサンプルをポリバッファを充填した前記分離流路に導入して分離する第一の分析を行ない、前記マーカサンプルの検出ピーク位置及び等電点からpH勾配関数 $f(x)$ を算出するpH勾配関数演算部と、
前記pH勾配関数 $f(x)$ を記憶するpH勾配関数記憶部と、
試料とともに複数種類のマーカサンプルを前記ポリバッファと同じポリバッファを充填した前記分離流路に導入して分離する第二の分析を行ない、検出した前記マーカサンプルの検出ピーク位置及び等電点に基づいて前記pH勾配関数 $f(x)$ を校正してpH勾配関数 $g(x)$ を得るpH勾配関数校正部と、
校正された前記pH勾配関数 $g(x)$ に基づいて、分離した試料成分のpHを決定する試料成分同定部と、を備えたことを特徴とするマイクロチップ電気泳動装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ペプチド、タンパク質等の両性電解質をその等電点で分離し分析する電気泳動装置に関し、さらに詳しくは分離流路の所定の範囲にわたって分離した試料成分を検出できる電気泳動装置に関するものである。

【0002】

【従来の技術】従来、ペプチドやタンパク質等を分離し分析する技術として、キャピラリー等電点電気泳動というものがある。図1は、従来のキャピラリー等電点電気泳動装置を表す概略図である。

【0003】内面処理を施して電気浸透流が生じないようにしたキャピラリー1内に種々の電離度をもつ多数の両性電解質混合物（ポリアミノポリカルボン酸混合物やポリアミノポリスルホン酸混合物など：ポリバッファという）を溶かした水溶液3を充填し、キャピラリー1の一端を水溶液3に含まれる電解質の中で最も酸性の強いものよりも低いpHを与える酸性の溶液（リン酸水溶液など）5に浸し、他端を水溶液3に含まれる電解質の中で最も塩基性の強いものよりも高いpHを与えるアルカリ性の溶液（水酸化ナトリウム水溶液など）7に浸す。溶

液5及び溶液7には電極が浸されており、溶液5は陽極液、溶液7は陰極液となっている。また、図示は省略されているが、キャピラリー1の検出点の位置に、紫外線吸収検出や電気伝導率検出等による検出器が備えられている。

【0004】溶液5及び溶液7に電圧をかけると、それぞれの両性電解質が等電点の位置まで移動したのち停止し、キャピラリー内にpH勾配が形成される。この時、溶液3にタンパク質などの両性電解質試料を加えておく
10 と、その成分はpH勾配上の等電点の位置で細いゾーンに濃縮される。定常状態に達したのち、ゾーンを検出点まで移動させるためにキャピラリー内の液を種々の方法で移動させ、各成分のゾーンを検出する。ゾーンを移動させる方法として、電極液を変えて電圧印加を続ける方法と、圧力差で押し出す方法がある。

【0005】図1に示した従来技術では、電圧を印加しながら両性電解質成分を等電点に濃縮する過程と、濃縮された成分のゾーンを検出点まで移動させる過程の2つの過程があり、ゾーンを移動させるために、電極液を変えて電圧印加を続けるか、又は圧力差で押し出す必要がある。ゾーンを移動させるこれらの方法は、どちらも時間がかかる上に、pH勾配上に正しく濃縮されたゾーンを検出点まで移動させることによりゾーンを乱れさせることは避けられない。

【0006】このような不具合を解決するために、ゾーンを移動させることなく検出する方法が提案されている。その方法は、分離が定常状態に達した後、分離流路の所定の範囲にわたって光を照射し、各位置における光の吸収又は発光を所定に範囲にわたって検出する。光検
30 出手段としては、分離流路に沿って配列されたアレイ状の受光素子を有する検出器などが用いられる。この方法では試料分離後にゾーンを移動させることがないので、分離状態を乱さずに、高速で測定を行なうことができる。

【0007】分離流路に形成されるpH勾配の位置精度及び再現性は、両性電解質の組成、注入状況などによって変化するため、pHを分離位置だけで正確に決定することは不可能である。これを解決するため、pHが既知のマーカサンプルを試料とともに分離流路に注入し、そのマーカサンプルをpH軸の基準点として、分離した試料成分のpHの決定を行なっている。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】通常は、手作業で、マーカサンプルの分離位置関係から、分離した試料成分のpHを決定しているため、pH軸による試料成分の自動同定は困難であった。また、pH勾配を詳細に把握するために多数のマーカサンプルを注入すると、試料とマーカサンプルとの区別が付きにくいという問題もあった。そこで本発明は、試料分離後にゾーンを移動させずに試料の同定を行なう等電点電気泳動装置において、試料成

分のpHを正確に自動で同定することを目的とするものである。

【0009】

【課題を解決するための手段】図2は本発明を表すブロック図である。所定の範囲にわたって分離流路からの光を検出する光検出手段2は、検出信号を分離流路の検出位置に対応して記憶する検出信号記憶部4に接続されている。検出信号記憶部4は、pH勾配関数 $f(x)$ を算出するpH勾配関数演算部6、pH勾配関数 $f(x)$ を校正してpH勾配関数 $g(x)$ を得るpH勾配関数校正部8、及び分離した試料成分をpH勾配関数 $g(x)$ に基づいて同定する試料成分同定部10に接続されている。pH勾配関数演算部6で算出されたpH勾配関数 $f(x)$ はpH勾配関数記憶部12に記憶された後、pH勾配関数 $g(x)$ 算出時にpH勾配関数校正部8に送られる。ここで、pH勾配関数とは、多数の両性電解質混合物を分離流路に充填して電圧を印加したときに形成されるpH勾配を表すものであり、検出位置（分離位置）に対するpHの関数である。

【0010】本発明による等電点電気泳動装置は、透明部材の内部に分離流路が形成された電気泳動部材と、分離流路の両端間に泳動電圧を印加する泳動電源装置と、分離流路の所定の範囲にわたって光を照射する照射手段と、分離流路内で分離された各成分による光の吸収又は発光を所定の範囲にわたって検出する光検出手段と、その光検出手段の検出信号を分離流路の各位置に対応させて記憶する検出信号記憶部と、複数種類の等電点既知のマーカサンプルをポリバッファを充填した分離流路に導入して分離する第一の分析を行ない、マーカサンプルの検出ピーク位置及び等電点からpH勾配関数 $f(x)$ を算出するpH勾配関数演算部と、pH勾配関数 $f(x)$ を記憶するpH勾配関数記憶部と、複数種類のマーカサンプルとともに試料を上記ポリバッファと同じポリバッファを充填した分離流路に導入して分離する第二の分析を行ない、検出したマーカサンプルの検出ピーク位置及び等電点に基づいてpH勾配関数 $f(x)$ を校正してpH勾配関数 $g(x)$ を得るpH勾配関数校正部と、pH勾配関数 $g(x)$ に基づいて、分離した試料成分のpHを決定する試料成分同定部とを備えるものである。

【0011】複数種類のマーカサンプルを分離流路に注入し分離して第一の分析を行ない、その分離状態を光検出手段2により検出して検出信号記憶部4に記憶し、各マーカサンプルの検出位置及び既知の等電点に基づいて分離流路におけるpH勾配関数 $f(x)$ をpH勾配関数演算部6により算出する。注入するマーカサンプルの種類は確実に分離できる範囲で多い方が好ましく、より高精度なpH勾配関数 $f(x)$ を算出することができる。そのpH勾配関数 $f(x)$ をpH勾配関数記憶部12に記憶する。

【0012】次に、試料とともに複数種類のマーカサン

プルを分離流路に注入し分離して第二の分析を行ない、その分離状態を光検出手段2により検出して検出信号記憶部4に記憶する。pH勾配関数校正部8により、pH勾配関数記憶部12から読み出したpH勾配関数 $f(x)$ を第二の分析におけるマーカサンプルの検出位置及び既知の等電点に基づいて、必要に応じて平行移動、伸縮などの校正を行ない、pH勾配関数 $g(x)$ を得る。注入するマーカサンプルは2、3種類といった少数でよい。マーカサンプル数が少なければ、試料ピークとマーカサンプルピークの区別がしやすくなる。

【0013】ここで、本発明では第一の分析及び第二の分析に同じポリバッファを用いている。第二の分析における試料の混入によるマーカの等電点への影響は弱いので、第一の分析及び第二の分析におけるpH勾配関数 $f(x)$ 、 $g(x)$ の基本的な形はあまり変わらず、pH勾配関数 $g(x)$ はpH勾配関数 $f(x)$ と比較して平行移動や伸縮変形のみを受けていると仮定することができる。試料成分同定部10により、校正されたpH勾配関数 $g(x)$ に基づいて、検出信号記憶部4に記憶された第二の分析のデータからそれぞれ分離した試料成分のpHを決定する。

【0014】

【実施例】図3は一実施例を表す概略構成図である。この実施例では本発明を、透明板状部材の内部に分離流路が形成されたマイクロチップを用いたマイクロチップ電気泳動装置に適用した。測定にはアレイ型光センサを用い、流路に沿ってライン状に光照射するか、又は流路に沿って光学的にスキャンすることにより光照射を行なう。検出方法としては、紫外線吸収による吸光度を求める方法やレーザ蛍光法など、濃度情報が得られる方法であればいずれも利用できる。この実施例では吸光度法を用い、検出器としてフォトダイオードを分離流路に沿って配列したアレイ型光検出器を用いている。

【0015】ガラス基板内部に分離流路14と試料導入流路16が交差して形成されたマイクロチップ18が備えられている。マイクロチップ18の一表面には、分離流路14の両端及び試料導入流路16の両端に対応する位置に、分離流路14又は試料導入流路16に達する穴がそれぞれ形成されている。分離流路14の両端及び試料導入流路16の両端に泳動電圧を印加する泳動電源装置20が備えられている。

【0016】光源22と分光器24により構成され、分離流路14の所定の範囲にわたって光を照射する光照射手段26が備えられている。マイクロチップ18の照射手段26とは反対側に、分離流路14からの光をそれぞれの位置で検出する光受光素子が分離流路14に沿って並べられたアレイ型光検出器28が備えられている。アレイ型光検出器28は、検出信号を増幅する増幅回路30及びアナログ信号をデジタル信号に変換するA/D変換器32を介して、CPU34に接続されている。図2

で示した検出信号記憶部4、pH勾配関数演算部6、pH勾配関数校正部8、試料成分同定部10及びpH勾配関数記憶部12は、CPU34により構成される。

【0017】マーカサンプルや試料、ポリバッファがそれぞれ入れられた容器36が設置されている。マイクロチップ18、容器36間を移動し、マーカサンプルや試料、ポリバッファを分離流路14又は試料導入流路16の一端に注入するニードル38が備えられている。ニードル38の動作はモータ40により駆動される。ニードル38には、設定された量のマーカサンプル、試料又はポリバッファを吸引/吐出するシリンジ42が接続されている。シリンジ42の動作はモータ44により駆動される。モータ40、44は、モータ制御回路44を介して、CPU34に接続され、CPU34により制御される。

【0018】マイクロチップ18の材質が石英やホウ珪酸ガラス等の場合は、分離流路14及び試料導入流路16の内壁表面は、電気浸透流が発生しないように、リニアアクリルアミドやポリビニルアルコール等により予め処理してシラノール基を化学修飾しておくことが好ましい。

【0019】次に、この実施例の動作を説明する。

(pH勾配関数 $f(x)$ の決定(第一の分析))CPU34により、モータ制御回路44を介してモータ40を駆動させ、ニードル38をポリバッファの入った容器36に移動させる。モータ44を駆動させて、シリンジ42により、所定量のポリバッファを吸引する。ニードル38をマイクロチップ18の分離流路14の一端の穴に移動させ、シリンジ42を動作させて、分離流路14及び試料導入流路16にポリバッファを充填する。ニードル38をマイクロチップ18上から退けた後、光照射手段26により、分離流路14の所定の範囲に光を照射する。分離流路14からの光をアレイ型光検出器28により検出し、増幅回路30、A/D変換器32を介して、CPU34の検出信号記憶部4にバックグラウンドとして記憶する。

【0020】次に、例えば等電点の異なる4種類のマーカサンプルを含む溶液(マーカサンプル溶液)の入った容器36にニードル38を移動させ、シリンジ42により、所定量のマーカサンプル溶液を吸引する。ニードル38をマイクロチップ18の試料導入流路16の一端の穴に移動させ、シリンジ42を動作させて、試料導入流路16にマーカサンプル溶液を注入する。ニードル38をマイクロチップ18上から退けた後、泳動電源装置20により分離流路14及び試料導入流路16より所定の電圧を所定の時間だけ印加し、マーカサンプルを分離流路14と試料導入流路16の交点に移動させる。さらに、所定の電圧を所定の時間だけ印加し、分離流路14のpH勾配に従って4種類のマーカサンプルを分離する。マーカサンプルはそれぞれの等電点位置に濃縮され

る。

【0021】分離完了後、光照射手段26により、分離流路14の所定の範囲に光を照射する。分離流路14からの光をアレイ型光検出器28により検出し、その検出信号を増幅回路30、A/D変換器32を介して、CPU34の検出信号記憶部4に送る。CPU34の検出信号記憶部4に、増幅及びA/D変換された検出信号を、検出位置に対応してバックグラウンドを差し引いて記憶する。

10 【0022】図4(a)は、第一の分析のマーカサンプルの分離を表すデータである。縦軸は検出強度、横軸は検出位置(x)を表す。検出位置(x)は、アレイ型光検出器28の分離流路に沿って並べられた検出素子の、分離流路14と試料導入流路16の交点側から数えた順番である。等電点がそれぞれpH1、pH2、pH3、pH4のマーカサンプルが検出位置x1、x2、x3、x4でそれぞれ検出されている。分離順序から各マーカサンプルを同定することができる。導電点の大小関係は、pH1<pH2<pH3<pH4である。

20 【0023】図4(b)は、第一の分析のpH勾配関数 $f(x)$ を表すグラフである。縦軸はpH、横軸は検出位置(x)を表す。pH勾配関数演算部6により、検出信号記憶部4に記憶された第一の分析データからそれぞれのマーカサンプルにおいて検出位置xに対するpHをプロットし、最小二乗法による多項式近似やスプライン補間などを用いてpH勾配関数 $f(x)$ を推定する。そのpH勾配関数 $f(x)$ をpH勾配関数記憶部12に記憶する。

30 【0024】(実試料の測定(第二の分析))第一の分析と同様にして、分離流路14及び試料導入流路16に第一の分析と同じポリバッファを注入し、分離流路14の所定の範囲に光を照射し、分離流路14からの光をアレイ型光検出器28により検出し、増幅回路30、A/D変換器32を介して、CPU34の検出信号記憶部4にバックグラウンドとして記憶する。試料と、試料とは区別できる等電点の異なる2種類のマーカサンプルとを含む溶液(試料溶液)の入った容器36にニードル38を移動させ、シリンジ42により、所定量の試料溶液を吸引する。ニードル38をマイクロチップ18の試料導入流路16の一端の穴に移動させ、シリンジ42を動作させて、試料導入流路16に試料溶液を注入する。

40 【0025】ニードル38をマイクロチップ18上から退けた後、泳動電源装置20により分離流路14及び試料導入流路16より所定の電圧を所定の時間だけ印加し、マーカサンプル及び試料を分離流路14と試料導入流路16の交点に移動させる。さらに、所定の電圧を所定の時間だけ印加し、分離流路14のpH勾配に従ってマーカサンプル及び試料を分離する。マーカサンプル及び試料成分はそれぞれの等電点位置に濃縮される。分離完了後、第一の分析と同様にして、分離状態を検出し、

その検出信号を検出信号記憶部4にバックグラウンドを差し引いて記憶する。

【0026】図5(a)は、第二の分析のマーカサンプルの分離を表すデータである。縦軸は検出強度、横軸は検出位置(x)を表す。等電点がそれぞれpH0、pH00のマーカサンプルが検出位置x0、x00でそれぞれ検出され、その間の検出位置に分離した試料成分が検出されている。導電点の大小関係は、pH0 < pH00である。

【0027】図5(b)は、第一の分析のpH勾配関数f(x)を実線で表し、第二の分析のpH勾配関数g(x)を一点鎖線で表すグラフである。縦軸はpH、横軸は検出位置(x)を表す。pH勾配関数校正部8により、検出信号記憶部4に記憶された第二の分析のデータからマーカサンプルのデータのみを取り出し、検出位置xに対するpHをプロットする。pH勾配関数記憶部12からpH勾配関数f(x)を読み出し、第二の分析のpHプロットに基づいてpH勾配関数f(x)を必要に応じて平行移動又は線形伸縮による校正を行ない、pH勾配関数g(x)を決定する。試料成分同定部10により、そのpH勾配関数g(x)と検出信号記憶部4に記憶された第二の分析のデータを用いて、各試料成分のpHを求める。

【0028】この実施例では、第一の分析時に等電点の異なる4種類のマーカサンプルを用いたが、これに限定されるものではなく、3種類以上のマーカサンプルを用いればpH勾配関数f(x)が求まる。第二の分析時にマーカサンプルが3種類以上ある場合は、pH軸は単純な比例伸縮ではなく、スプライン曲線などを用いた高次の関数フィットをすることによりpH精度をさらに向上させることができる。

【0029】

【発明の効果】本発明は、試料分離後にゾーンを移動さ

せずに試料の同定を行なう等電点電気泳動装置において、複数種類のマーカサンプルをポリバッファを充填した分離流路に導入し、マーカサンプルの検出ピーク位置及び等電点からpH勾配関数f(x)を算出する第一の分析と、複数種類のマーカサンプルとともに試料を上記ポリバッファと同じポリバッファを充填した分離流路に導入し、検出したマーカサンプルの検出ピーク位置及び等電点に基づいてpH勾配関数f(x)を平行移動や伸縮させて校正を行なってpH勾配関数g(x)を求め、pH勾配関数g(x)に基づいて、分離した試料成分のpHを決定する第二の分析を行ない、試料成分のpHを自動的に決定するようにしたので、分析作業の効率化を図ることができ、さらに信頼性の高いデータが得られる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 従来のキャピラリー等電点電気泳動装置を表す概略図である。

【図2】 本発明を表すブロック図である。

【図3】 一実施例を表す概略構成図である。

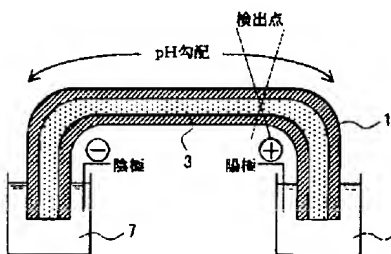
【図4】 (a)は、第一の分析のマーカサンプルの分離を表すデータであり、(b)は、第一の分析のpH勾配関数f(x)を表すグラフである。

【図5】 (a)は、第二の分析のマーカサンプルの分離を表すデータであり、(b)は、第一の分析のpH勾配関数f(x)を実線で表し、第二の分析のpH勾配関数g(x)を一点鎖線で表すグラフである。

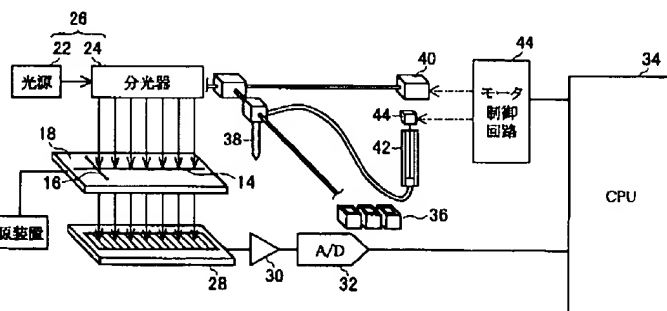
【符号の説明】

- | | |
|----|-----------|
| 2 | 光検出手段 |
| 4 | 検出信号記憶部 |
| 6 | pH勾配関数演算部 |
| 8 | pH勾配関数校正部 |
| 10 | 試料成分同定部 |
| 12 | pH勾配関数記憶部 |

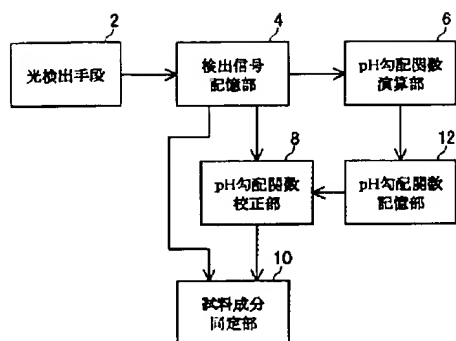
【図1】



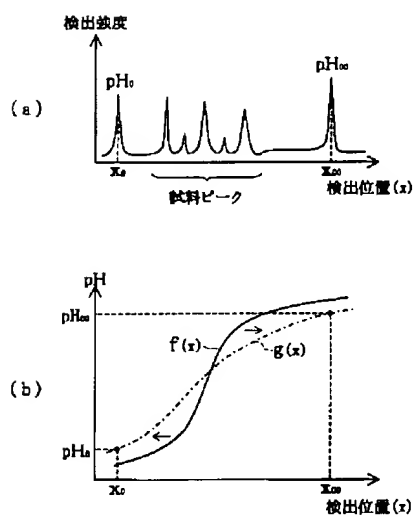
【図3】



【図2】



【図5】



【図4】

